

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Juli 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/051429 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15147

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Dezember 2001 (20.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 64 195.4 22. Dezember 2000 (22.12.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MIGRAGEN AG [DE/DE]; Spemannstrasse 35,
72076 Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MONNIER, Philippe,
P. [FR/DE]; Quenstedtstrasse 34, 72076 Tübingen (DE).
MUELLER, Bernhard, K. [DE/DE]; Fürststrasse 49,
72072 Tübingen (DE). SCHWAB, Jan. [DE/DE]; Ried-
strasse 9, 72076 Tübingen (DE).

(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost,
Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, 81679
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW).
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF A COMPOSITION FOR THE STIMULATION OF NERVE GROWTH, THE INHIBITION OF SCAR TISSUE
FORMATION, THE REDUCTION OF SECONDARY DAMAGE AND/OR THE ACCUMULATION OF MACROPHAGES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER ZUSAMMENSETZUNG ZUR STIMULATION DES NERVENWACHSTUMS.
ZUR INHIBITION DER NARBENGeweBSBILDUNG, ZUR REDUKTION EINES SEKUNDÄRSCHADENS UND/ODER
ZUR AKKUMULATION VON MAKROPHAGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of a composition, comprising a fusion protein and at least one transporter for
the *in-vivo* inhibition of scar tissue formation, the *in-vivo* reduction of secondary damage and/or the *in-vivo* accumulation of
macrophages. The fusion protein contains at least one binding domain for the transporter and at least one modulation domain for
the covalent modification of small GTP-binding proteins. The transporter permits the uptake of the fusion protein in a target cell.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Zusammensetzung enthaltend ein Fusionsprotein
und mindestens einen Transporter zur *In-vivo*-Inhibition der Narbengewebsbildung, zur *In-vivo*-Reduktion eines Sekundärschadens
und/oder zur *In-vivo*-Akkumulation von Makrophagen, wobei das Fusionsprotein mindestens eine Bindungsdomäne für den Trans-
porter und mindestens eine Modulationsdomäne zur kovalenten Modifikation von kleinen GTP-bindenden Proteinen enthält, und
der Transporter die Aufnahme des Fusionsproteins in eine Zielzelle vermittelt.

Best Available Copy

WO 02/051429 A2

Verwendung einer Zusammensetzung zur Stimulation des Nervenwachstums, zur Inhibition der Narbengewebsbildung, zur Reduktion eines Sekundärschadens und/oder zur Akkumulation von Makrophagen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Zusammensetzung enthaltend ein Fusionsprotein und mindestens einen Transporter zur *In-vivo*-Stimulation des Nervenwachstums, zur *In-vivo*-Inhibition der Narbengewebsbildung, zur *In-vivo*-Reduktion eines Sekundärschadens und/oder zur *In-vivo*-Akkumulation von Makrophagen, wobei das Fusionsprotein mindestens eine Bindungsdomäne für den Transporter und mindestens eine Modulationsdomäne zur kovalenten Modifikation von kleinen GTP-bindenden Proteinen enthält, und der Transporter die Aufnahme des Fusionsproteins in eine Zielzelle vermittelt.

Rückenmark und Gehirn bilden bei den Wirbeltiere das zentrale Nervensystem (ZNS). Das Rückenmark verläuft in Körperlängsrichtung und wird von dem Wirbelkanal umgeben. Es lässt sich beim Menschen in acht Hals-, zwölf Brust-, fünf Lenden-, fünf Kreuzbein- und ein bis zwei Steißbeinsegmente gliedern. Die zentrale graue Substanz mit ihren seitlichen Ausladungen (Vorder- und Hinterhorn) wird von den Zellkörpern der Nervenzellen und die periphere weiße Substanz durch die markhaltige Nervenfaserbündel gebildet. In der weißen Substanz verlaufen afferente (aufsteigende, sensible) und efferente (absteigende, effektorische) Leitungsbahnen. Die absteigenden Bahnen des Rückenmark werden in die Pyramidenbahnen (willkürliche Bewegungen) und extrapyramidale Bahnen (unwillkürliche Bewegungen; Verteilung des Muskeltonus) unterschieden. Der größte Teil der pyramidalen Fasern verläuft gekreuzt in der Pyramidenstrangbahn der Gegenseite und zum kleineren Teil ungekreuzt in der Pyramiden-

vorderstrangbahn zu Vorderhorn- und Hinterhornzellen der verschiedenen Rückenmarkssegmente.

Rückenmark und Gehirn werden von zwei Zellklassen gebildet. Nervenzellen und
5 Gliazellen. Die Gliazellen werden in Oligodendrozyten und Astrozyten untergliedert. Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden der Nervenaxone, Astrozyten versorgen die Nervenzellen mit Nährstoffen, nehmen ausgeschüttete Neurotransmitter auf und bilden die Blut-Hirn-Schranke. Myelin ist die fetthaltige Isolationshülle, die Nerven spiralförmig umgibt. Diese Umhüllung ist für die
10 störungsfreie Weiterleitung der elektrischen Impulse am Nerv entlang verantwortlich.

Bei zahlreichen Krankheiten, wie beispielsweise Multiple Sklerose, Encephalitis periaxialis, diffuse Sklerose, Encephalomyelitis acuta disseminata, Neuromyelitis
15 optica, SMON (subakute myelooptische Neuropathie), angeborene Entmarkungskrankheiten, wie Leukodystrophien und bei generell immunmedierten entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems, wie Neuro-Behcet und Kawasaki-Syndrom, können die Myelinscheiden angegriffen und zerstört werden. In der Folge kommt es dann zu einer elektrischen
20 Leitungsblockade und neurologischen Symptomen mit dem Verlust vieler wichtiger Funktionen. Eine Verletzung des Rückenmarks z.B. infolge eines Unfalls führt zu einer dauerhaften Unterbrechung der Leitungsfunktion der betroffenen Nervenfasern. Eine Lähmung in Folge eines völligen Ausfalls von mindestens einem Segment bezeichnet man als Querschnittslähmung. Die Folge
25 ist der Verlust der sensiblen (z. B. Temperatur-, Schmerz- oder Druckempfindungen), motorischen (willkürliche und unwillkürliche Bewegung) und vegetativen Funktionen (z.B. Blasen- und Darmfunktion) für alle Gebiete unterhalb des betroffenen Segments. Aufgrund der schlechten regenerativen Fähigkeiten der Nervenfasern bleibt die Lähmung der Willkürmotorik und der
30 vollständige Sensibilitätsverlust dauerhaft bestehen.

Traumatische Läsionen im ZNS führen zum Absterben von Zellen direkt am Verletzungsort. Hierbei entstehen große Mengen an regenerationshemmenden Zellresten und inhibitorischen Myelinbestandteilen. Bei Verletzungen im peripheren Nervensystem werden diese schnell durch Makrophagen entfernt. Diese Entzündungsreaktion ist im ZNS verzögert und fällt geringer aus. Daraus resultiert, dass die inhibitorischen Myelinreste lange am Verletzungsort verbleiben. Werden, durch Kontakt mit peripheren Nerven aktivierte, Makrophagen in die Verletzungsstelle im ZNS eingebracht, entfernen diese die Myelinreste und induzieren dadurch die Regeneration der Nervenaxone (Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Schwartz M, 1998, *Glia*, 24: 329-337).

Die primäre, mechanisch verursachte Läsion (Primärschaden) wird durch sekundäre Phänomene (Sekundärschaden) vergrößert und die Narbenbildung beginnt. Zunächst kommt es zu einer räumlich ausgedehnten Reaktion der Astrozyten. Diese ist an der Hochregulierung von GFAP (glial fibrillary acidic protein) erkennbar. Astrozyten nahe der Verletzungsstelle regulieren die Vimentin und Nestin Produktion hoch und Zellteilung wird beobachtbar. An der Grenze zwischen eingewanderten meningealen Zellen und überlebenden Astrozyten wird eine neue *Glia limitans* gebildet. Daraufhin werden Astrozyten in diesem Gebiet hypertroph (vergrößern sich), bilden viele feine Fortsätze und einige teilen sich.

Die fertige Narbe besteht hauptsächlich aus hyperfilamentösen Astrozyten, deren Fortsätze über viele gap und tight junctions miteinander verwoben sind und so enggepackt sind, dass nur noch wenig Extrazellulärraum frei bleibt. Damit stellt die Narbe ein mechanisches, kaum zu überwindendes Hindernis für regenerierende Axone dar. Darüber hinaus enthält die Narbe aber auch noch eine Vielzahl an regenerationshemmenden Substanzen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG, z.B.: Aggrecan, Versican, Neurocan, Brevican, Phosphacan, NG2) und um Tenascin (Fawcett JW and Asher RA, 1999, *Brain Research Bulletin*, 49: 377-391).

Es sind aber auch neurologische und neurodegenerative Erkrankungen des peripheren und zentralen Nervensystems bekannt, bei denen Nervenzellen zugrunde gehen. Dies sind z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose und ähnliche Erkrankungen, die mit einem Nervenfaserverlust und Entmarkung einhergehen, sowie Amyotrophe Lateral Sklerose und andere Motoneuronenerkrankungen, Ischämie, Schlaganfall, Epilepsie, Morbus Huntington, AIDS Demenz Komplex und Prionen-Erkrankungen.

Ziel der Forschung ist es daher, bei Läsionen des Rückenmarks eine Regeneration der Nervenaxone über die Verletzung hinweg zu bewerkstelligen und bei anderen Krankheiten des peripheren und zentralen Nervensystems, das Nervenwachstum zu stimulieren. Die Narbenbildung im zentralen Nervensystem der Säugetiere stellt ein enormes Regenerationshemmnis für wachsende Nervenfasern dar. Aus diesem Grund sind die Verlangsamung oder Verhinderung der Narbenbildung sowie die Stimulation des Nervenfaserwachstums wesentliche therapeutische Ziele bei neuroregenerativen Behandlungskonzepten.

Einen Ansatzpunkt bietet die Einflußnahme auf Signaltransduktionswege in Nervenzellen. Es ist bekannt, daß die Aktivierung kleiner GTP-bindender Proteine aus der Familie der Rho-GTPasen (Rho A, B, C) zu einer starken Wachstums-
hemmung von Nervenfasern unter Zellkulturbedingungen führt (Mueller BK, 1999, Annu. Rev. Neurosci. 22: 351-388). Experimentelle Belege sprechen dafür, daß die spezifische Aktivierung von Rho A, B und/oder C im Inneren der Nervenfasern durch potente, außen an der Membran angreifende regenerationshemmende Proteine des adulten Säuger-Gehirns (NOGO, MAG, RGM, Ephrin-A5) einen wesentlichen Mechanismus der Inhibition des Nervenfaserwachstums darstellt (Jin Z und Strittmatter SM, 1997, J. Neurosci. 17: 6256-6263; Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L, 1999, J. Neurosci. 19: 7537-7547; Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK, 2000, J. Cell. Biol. 149: 263-270). Die Aktivierung von Rho A-C führt bei neu aussprossenden Nervenfasern zum

Kollaps des Wachstumskegels, der distalen Spitze des Neuriten, und verhindert dadurch die Ausbildung neuer Nervenbahnen.

Bei reifen Oligodendrozyten führt die Bindung von NGF (nerve growth factor) an
5 den p75-Rezeptor zur Apoptose (Casaccia-Bonofil P, Carter BD, Dobrowsky
RT, Chao MV, 1996, Nature, 383: 716-719). Bei neuronalen Zellen ist die
intrazelluläre Domäne von p75 direkt an Rho A-C gebunden. Bindung von
Neurotrophinen an den p75-Rezeptor verringert die Aktivität von Rho A und führt
dadurch zur Neuritenelongation. Wird die Aktivität von Rho A durch eine
10 Mutation (Val¹⁴-Rho A) permanent erhöht, führt die Zugabe von NGF nicht zum
Neuritenwachstum. (Yamashita T, Tucker KL, Barde Y-A, 1999, Neuron, 24:
585-593). Die direkte Einflußnahme auf Rho A unterbindet die
Signaltransduktionskaskade von NGF-p75 und sollte dadurch auch die
apoptotische Wirkung der Bindung von NGF an p75 bei Oligodendrocyten
15 hemmen.

Aus dem Stand der Technik ist das bakterielle Exoenzym C3-Transferase als
spezifischer Inhibitor von Rho A, B und C bekannt (Aktories K, Schmidt G, Just
I, 2000, Biol. Chem. 381:421-426). Dieses Protein ADP-ribosyliert Rho A-C am
20 Argininrest 41 und inhibiert dadurch diese Rho-GTPasen (Aktories et al., 2000,
supra). Um eine ausreichende Aktivierungsblockade der Rho-GTPasen zu
erreichen, müssen über 90% der intrazellulären Rho A-C Proteine ADP-ribosyliert
und damit inaktiviert werden. Die C3-Transferase besitzt jedoch eine sehr
schlechte Membranpermeabilität und wird daher nur in geringsten Mengen (ca.
25 1% der Ausgangsmenge) von den Zellen aufgenommen. Für eine Inaktivierung
von 90% der intrazellulären Rho A-C Proteine sind folglich sehr hohe C3-
Transferasemengen erforderlich. Infolge dessen müßten für pharmazeutische
Anwendungen sehr hohe Mengen dieser als Toxine bekannten C3-Transferasen
verabreicht werden. Hierdurch können toxische Nebenwirkungen nicht
30 ausgeschlossen werden. Daher ist die pharmakologische Verwendung der C3-
Transferase alleine aufgrund ihrer Toxizität nicht geeignet.

Um einen besseren Transport der Wirkstoffkomponente C3-Transferase durch die Plasmamembran der Zellen zu erreichen, wurde ein chimäres Fusionsprotein hergestellt (DE 197 35 105). Zu diesem Zweck wurde das binäre Aktin ADP-ribosylierende C2-Toxin aus *Clostridium botulinum* verwendet. Das C2-Toxin besteht aus zwei Proteinen, der C2I-Komponente, die enzymatisch aktiv ist, sowie der C2II-Komponente, die die Bindung an die Plasmamembran und eine nachfolgende Translokation vermittelt. Die enzymatische Aktivität des C2I-Proteins ist im C-terminalen Bereich lokalisiert, während die Bindung an C2II über den N-terminalen Bereich erfolgt. Um die C3-Transferase mit Hilfe dieses effizienten Aufnahmemechanismus in die Zellen einzuschleusen, wurde ein chimäres Fusionsprotein aus C3-Transferase (aus *Clostridium limosum*) und aus dem N-terminalen C2I-Protein hergestellt (Fig. 1). Dieses C3-C2IN-Fusionsprotein gelangt nun mit Hilfe des Bindeproteins C2II ins Innere der Zellen (Barth H, Hofmann C, Olenik C, Just I, Aktories K, 1998, *Infect. Immun.* 66: 1364-1369). Der Komplex aus C3-C2IN und C2II wird über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert und gelangt in intrazelluläre Vesikel. Aus diesen Vesikeln gelangt das Fusionsprotein C3-C2IN ins Cytosol, kann dort seine Wirkung entfalten und Rho A-C ADP-ribosylieren und dadurch inaktivieren. Dieser binäre Proteinkomplex aus C3-C2IN und C2II verbindet die Wirkeigenschaften der C3-Transferase mit einer um Faktor 100-1000 verbesserten Membranpermeabilität und gewährleistet dadurch eine wesentlich bessere intrazelluläre Verfügbarkeit. Dies ist auch der Grund dafür, daß nur noch geringe Mengen an C3-C2IN nötig sind, um eine 90prozentige Hemmung von Rho A-C zu erreichen. Die Wirksamkeit wurde bisher nur in *In-vitro*-Experimenten gezeigt (Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK, 2000, *J. Cell. Biol.* 149: 263-270). In diesen Experimenten mit embryonalen Zellen oder Zelllinien - also proliferationskompetenten Zellen - konnten Neuritenwachstums-stimulierende Effekte nachgewiesen werden (Wahl S, 2000, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften. Fakultät der Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen). Die mit C3-C2IN und C2II behandelten Neuriten waren resistent gegenüber potenten Inhibitoren wie Ephrin-A5 und RGM (Wahl S, 2000, *supra*).

Darüber hinaus wurde noch ein zweites chimäres Fusionsprotein, ein chimärer C. botulinum C2/C3 Inhibitor, beschrieben (WO 99/08533). Bei dieser Chimäre wurde die Domäne des C2, die ADP-Ribosylierungsaktivität besitzt, deletiert und
5 durch das C3-Enzym ersetzt wurde. Es handelt sich hierbei also um ein C2II-C3 Fusionsprotein.

Bisher ist jedoch keine Verwendung bekannt, mit der es möglich wäre, adulte Nervenzellen - also Zellen mit stark eingeschränkten proliferativen Eigenschaften
10 *in vivo* dauerhaft zu stimulieren. Die *In-vivo*-Verwendung von C3 war nur an frisch durchtrennten Nervenzellen möglich und führte nur zu kurzzeitigen Effekten, da C3 von regenerierenden Nervenfasern nur in geringem Umfang aufgenommen wird (Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L, 1999, J. Neurosci. 19: 7537-7547).
15 Deshalb und aufgrund der hohen Dosen die eingesetzt werden müssen, ist dieses System nicht geeignet, motorische oder sensorische Funktionen nach Rückenmarkstrennung wieder herzustellen. Für andere Rho-Inhibitoren liegen keine *In-vivo*-Daten vor.

20 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, die Funktion von Nervenfasern nach Verletzung oder infolge von Erkrankungen *in vivo* wieder herzustellen und damit sie ihre Funktionen wieder zurückzuerlangen. Somit soll eine partielle oder totale Regeneration bei Krankheiten oder Verletzungen des peripheren und zentralen Nervensystems erreicht werden.

25 Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung einer Zusammensetzung enthaltend ein Fusionsprotein und mindestens einen Transporter zur *In-vivo*-Stimulation des Nervenwachstums, zur *In-vivo*-Inhibition der Narbengewebsbildung, zur *In-vivo*-Reduktion eines Sekundärschadens
30 und/oder Akkumulation von Makrophagen, wobei das Fusionsprotein mindestens eine Bindungsdomäne für den Transporter und mindestens eine Modulationsdomäne zur kovalenten Modifikation von kleinen GTP-bindenden

Proteine enthält, und der Transporter die Aufnahme des Fusionsproteins in eine Zielzelle vermittelt.

5 Unter erfindungsgemäßer Verwendung der Zusammensetzung konnten überraschenderweise nicht nur die Effekte von Myelin-assoziierten Inhibitoren wie NOGO, MAG und CSPG, sondern auch die Effekte potenter anderer Inhibitoren wie z. B. Semaphorin und RGM (Repulsive Guidance Molecule) und der inhibitorischen Narben-assoziierten Chondroitinsulfat-Proteoglykane aufgehoben werden.

10

Überraschenderweise konnte unter Verwendung des oben beschriebenen Systems nicht nur die Blockade des Neuritenwachstums durch regenerationshemmende Proteine aufgehoben werden, sondern sogar das Nervenfaserwachstum aktiv stimuliert werden.

15

Weiterhin war überraschend, daß die erfindungsgemäße Verwendung der Zusammensetzung nicht nur die Inaktivierung von Rho A-C, sondern auch auf der Aktivierung von Cdc42 und Rac bewirkte. Die Aktivierung von Rac und Cdc42 in Nervenzellen führt zur Bildung von Finger-artigen Filopodien und Lamellipodien (Häuten zwischen den Filopodien) (Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L, 1997, 20 Mol Cell Biol 17: 1201-1211). Filopodien und Lamellipodien sind für das zielgerichtete Wachstum von Nervenfasern notwendig. Aktivatoren von Rho, wie z. B. Myelin-Inhibitoren, RGM oder Ephrin-A5, die außen an der Nervenfasern angreifen, hemmen jedoch die Fortbewegung der Nervenfasern, indem sie ein drastisches Zurückziehen der Nervenfasern auslösen. Die Hemmung von Rho A-C 25 verhindert dies, führt jedoch alleine nicht zum Weiterwachsen der Nervenfasern, denn dafür ist die Aktivierung von Cdc42 und Rac nötig. Somit ist die Kombination von Hemmung der Rho A-C und Aktivierung von Cdc42 und Rac besonders effizient zur Stimulation des Nervenfaserwachstums.

30

Überraschenderweise wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Systems die Anzahl von ED-1 positiven Makrophagen an der Injektionsstelle stark erhöht.

Makrophagen entfernen regenerationshemmende Zellreste und inhibitorische Myelinbestandteile aus dem Verletzungsgebiet und sezernieren Cytokine, die die Aktivität von Astro- und Oligodendrocyten modulieren und dadurch die Regeneration von Nervenfasern fördern. Darüber hinaus induzieren Makrophagen, die früh im Verletzungsgebiet auftauchen eine erneute Remyelinisierung demyelinisierter Nervenfasern (Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, van Rooijen N, Franklin RJM, 2001, Glia, 35: 204-212).

Ebenfalls überraschend war die Beobachtung, daß unter erfindungsgemäßer Verwendung der Zusammensetzung die Anzahl der Narbengewebe-bildenden Astrozyten verringert und damit die Bildung von Narbengewebe reduziert war. Es entstand weniger Narbengewebe, welches auch in einer weniger kompakten Weise wuchs, so daß Raum zum Wachstum der Nervenfasern blieb. Die Lakunen- und Hohlraumbildung war stark herabgesetzt und damit die sekundäre Schädigung drastisch reduziert. Hierdurch wurde die Regeneration von Nervenfasern positiv beeinflusst.

Alle Effekte zusammen bewirkten nach Rückenmarksläsion eine Wiederherstellung der motorischen, sensorischen und vegetativen Funktionen über die Verletzungsstelle des Rückenmark hinaus. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß Ratten nach Läsion des Rückenmarks auf Höhe des achten Thorakalwirbels (TH8) und einmaliger Injektion von C3-C2IN und C2II ihre Hinterbeine wieder bewegen konnten und keine nennenswerten Lähmungserscheinungen übrig behielten. Neben den motorischen wurden auch sensorische und vegetative Funktionen wieder hergestellt. Die Ratten zeigten eine Reaktion auf äußere Reize (z. B. Schmerz) und konnten ihre Blase wieder selbständig leeren (siehe Beispiel 2).

Unter einer *In-vivo*-Stimulation des Nervenwachstum im Sinne der vorliegenden Erfindung wird eine beschleunigtes und/oder vermehrtes Nervenwachstum verstanden, wobei sich dieses auf das Ausmaß und/oder die Geschwindigkeit des Wachstums beziehen kann. Vorzugsweise wachsen die Nervenfasern mindestens

um ca. Faktor 2, bevorzugt um ca. Faktor 3, am meisten bevorzugt um ca. Faktor 4, schneller und/oder weiter. Alternativ ist die Anzahl der wachsenden Fasern mindestens um ca. Faktor 2, bevorzugt um ca. Faktor 3, am meisten bevorzugt um ca. Faktor 4, erhöht. Unter einer *In-vivo*-Inhibition der Narbengewebsbildung im Sinne der vorliegenden Erfindung wird eine ca. 50prozentige, bevorzugt eine ca. 75prozentige, am meisten bevorzugt eine ca. 90prozentige Reduktion des Narbengewebes und/oder der Lakunen- oder Hohlraumbildung verstanden. Daraus ergibt sich, daß die Inhibition eine völlige oder teilweise Inhibition sein kann. Geeignete Tests zur Quantifizierung der Parameter sind in Beispiel 2 beschrieben. Unter Sekundärschäden versteht man im Gegensatz zu Primärschaden solche Schäden, die erst als weitere Folge der anfänglichen Verletzung (des Primärschadens) auftreten. Unter Sekundärschaden in Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man im Gegensatz zu Primärschaden, die durch pathophysiologische Mechanismen verursachte Vergrößerung einer initial Läsionsstelle (Primärschaden). Beispiele hierfür sind eine ischämische Nekrose, die Apoptose von Nervenfasern und anderen Zellen sowie inflammatorische Reaktionen. Unter einer *In-vivo*-Reduktion eines Sekundärschadens in Sinne der vorliegenden Erfindung wird eine ca. 50prozentige, bevorzugt eine ca. 75prozentige, am meisten bevorzugt eine ca. 90prozentige Reduktion eines Sekundärschadens verstanden. Unter einer Akkumulation von Makrophagen wird die Erhöhung der Makrophagenzahl, insbesondere am Wirk- und/oder Verabreichungsort, verstanden. Hierbei ist die Zahl der Makrophagen mindestens um ca. Faktor 2, bevorzugt um ca. Faktor 3, am meisten bevorzugt um ca. Faktor 4, erhöht. Unter dem Wirkort wird der Ort verstanden, an dem die erfindungsgemäße Zusammensetzung ihre Wirkung auf die Neuronen, das Nervengewebe und/oder benachbarte Zellen oder Gewebe entfaltet. Unter dem Verabreichungsort im Sinne der vorliegenden Erfindung wird der Ort verstanden, an dem die erfindungsgemäße Zusammensetzung im Körper freigesetzt wird. Unter einem Fusionsprotein versteht man das Expressionsprodukt eines fusionierten Gens. Ein fusioniertes Gen entsteht aus der Verknüpfung zweier oder mehrerer Gene oder Genfragmente, wobei eine neue Kombination erzeugt wird.

In der vorliegenden Erfindung enthält das Fusionsprotein eine Modulationsdomäne und eine Bindungsdomäne.

Ein GTP-bindendes Protein ist ein Protein, das GTP (Guanosintriphosphat) bindet und infolge einer zellulären Signalkaskade zu GDP (Guanosindiphosphat) hydrolysiert. Die Signal-induzierte Hydrolyse des GTP zu GDP bewirkt die Interaktion des GTP-bindenden Proteins mit einem Effektormolekül. Man unterscheidet zwischen heterotrimeren (großen) GTP-bindenden Proteinen und monomeren (kleinen) GTP-bindenden Proteinen. Die heterotrimeren GTP-
10 bindenden Proteinen bestehen aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit, wohingegen die monomeren GTP-bindenden Proteine nur aus einer Untereinheit bestehen. Zu der Gruppe der kleinen GTP-bindenden Proteine gehören beispielsweise die Mitglieder der Ras-, Rho-, Rab-, Arf-, Sar- und Ran-Familie. Die Rho-GTPasen der Säugetiere können in sechs verschiedene Klassen eingeteilt
15 werden: Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rac (Rac 1, Rac 2, Rac 3, Rho G), Cdc42 (Cdc42Hs, G25K, TC10), Rnd (RhoE/Rnd3, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7), Rho D und TTF.

Ein GTP-bindendes Protein besitzt eine Guaninnukleotid-Bindungstelle, an der sowohl GTP oder GDP gebunden sein kann. In der GTP-gebundenen Form ist das
20 Protein aktiv, in der GDP-gebundenen Form inaktiv. Der Austausch von GDP und GTP und somit die Aktivierung des GTP-bindenden Moleküls wird durch den in der Signalkaskade dem GTP-bindenden Protein vorgeschalteten Aktivator vermittelt. Die Aktivierung des Effektor, also des dem GTP-bindenden Protein in
25 der Signaltransduktion nachgeschalteten Moleküls, bewirkt die Spaltung des GTP zu GDP und anorganischen Phosphat. Hierdurch wird das GTP-bindende Protein wieder inaktiviert. Die Regulation der Signalkaskade auf Ebene des GTP-bindenden Proteins wird in der Zelle durch mindestens drei weitere Proteine reguliert; GTPase-aktivierende Proteine (GAP) unterstützen die GTP-Hydrolyse,
30 Guaninnukleotidaustausch-Faktoren (GEF) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) unterdrücken die Dissoziation des GDP vom kleinen GTP-bindenden Protein (siehe hierzu Hall A, 1998, Science

279: 509-514; Mueller BK, 1999, Annu Rev Neurosci 22: 351-388; Luo L, 2000, Nature Review Neurosci 1,3: 173-180)

Bei erfindungsgemäßer Verwendung der Zusammensetzung wird die Aktivität des
5 kleinen GTP-bindenden Proteins geändert. Unter einer Änderung der Aktivität
von kleinen GTP-bindenden Proteinen im Sinne der vorliegenden Erfindung
versteht man eine Erhöhung oder Erniedrigung der Aktivität. Die Erniedrigung
kann zu einer teilweisen oder völligen Hemmung oder Inaktivierung führen. Die
Aktivität des kleinen GTP-bindenden Proteins wird mindestens um Faktor 2,
10 bevorzugt um ca. Faktor 3 oder um ca. Faktor 4, am meisten bevorzugt um ca.
Faktor 10, erhöht oder erniedrigt. Dem Fachmann sind einschlägige Methoden
bekannt, mit der die Aktivität von kleinen GTP-bindenden Proteinen bestimmt
werden kann. Beispielsweise könnte in einem Enzymtest die Hydrolyse-Aktivität
des kleinen GTP-bindenden Proteins mit GTP als Substrat, das an der γ -
15 Phosphatgruppe markiert ist (z. B. radioaktiv), bestimmt werden (Read PW und
Nakamoto RK, 2000, Methods in Enzymology 325: 15; Self AJ und Hall A, 1995,
Methods in Enzymology 256: 67).

Die Veränderung der Aktivität durch die Modulationsdomäne kann beispielsweise
20 durch Wechselwirkung mit GAP, GDI GEF oder dem kleinen GTP-bindenden
Protein erfolgen. Dabei kann u. a. die Geschwindigkeit der Hydrolyse von GTP zu
GDP, die Dissoziation von GDP oder die Bindung von GTP beeinflusst werden.
Dies könnte beispielsweise durch kovalente oder nicht-kovalente Modifikation
eines der beteiligten Proteine durch die Modulationsdomäne erfolgen. (Bishop AL
25 and Hall A, 2000, Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J 348: 241-
255; Hall A, 1999, Signal transduction pathways regulated by the Rho family of
small GTPases. Br J Cancer 80 Suppl 1:25-27; Kjoller L und Hall A, 1999,
Signaling to Rho GTPases. Exp Cell res 253: 166-179)

30 In einer bevorzugten Ausführungsform wird das kleinen GTP-bindenden Molekül,
vorzugsweise Rho A-C, durch kovalente Modifikation teilweise oder völlig
gehemmt. Vorzugsweise geschieht dies durch ADP-Ribosylierung oder

Glykosylierung des kleinen GTP-bindenden Proteins, d. h. ADP-Ribose oder ein Saccharid wird kovalent gebunden. Diese Modifikation führt zu einer veränderten Signaltransduktion auf Ebene des kleinen GTP-bindenden Moleküls.

5 In einer weiteren Ausführungsform wird die Änderung der Aktivität der kleinen GTP-bindenden Proteine durch nicht-kovalente Modifikation erzielt. Beispielsweise könnte ein Molekül an das kleine GTP-bindende Protein angelagert werden, welches z.B. durch Änderung der Konformation des Proteins eine aktive oder inaktive Form stabilisiert. In einer weiteren Ausführungsform könnte aber auch
10 ein Molekül in die Bindungstasche des kleinen GTP-bindenden Proteins eingelagert werden, so daß das GTP nicht mehr gebunden werden kann, und so die Aktivität des kleinen GTP-bindenden Proteins reduziert ist. Beispielsweise kann die Aktivität von RhoGTPasen durch Rho-inhibierende Toxine wie z.B. ExoS (*Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S), SptP (*Salmonella typhimurium*
15 protein tyrosine Phosphatase) oder YopE (*Yersinia pseudotuberculosis* outer protein E) oder durch Rho-aktivierende Toxine wie z.B. SopE (*Salmonella typhimurium* outer protein E) verändert werden (Lerm M, Schmidt G, Aktories K, 2000, FEMS Microbiology Letters 188: 1-6; Aktories K, Schmidt G, Just I, 2000, Biol Chem 381: 421-426).

20

In einer weiteren Ausführungsform wird die Modifikation nicht durch die Modulationsdomäne selbst, sondern durch ein in der Signalkaskade dem kleinen GTP-bindenden Protein vor- oder nachgeschalteten Signalmolekül bewirkt. Die Modulationsdomäne würde dann ein solches Signalmolekül aktivieren, welches
25 dann wiederum z.B. das kleine GTP-bindende Protein phosphoryliert (indirekte Modulation). Beispielsweise phosphoryliert die Proteinkinase A (PKA) in Lymphozyten aktives GTP-gebundenes RhoA und induziert über Rho-GDI seine Translokation von der Membran ins Cytosol, dadurch wird die Rho-Aktivierung auf zweierlei Arten beendet. Das Signalmolekül cAMP aktiviert die PKA, diese
30 phosphoryliert RhoA und inhibiert es dadurch, gleichzeitig wird eine Aktivierung von RhoA verhindert, indem es durch Rho-GDI von der Membran ins Cytosol transportiert wird (Mueller BK, 1999, Annu Rev Neurosci 22: 351-388; Lang P,

Gespert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J, 1996, EMBO J 15: 510-519; Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC, 1997, J Biol Chem 272: 24141-24144).

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die GTP-bindenden Proteine Rho A, B oder C kovalent modifiziert. Besonders bevorzugt ist die ADP-Ribosylierung des Asparagin-Restes an Position 41. Damit verbunden ist eine Inaktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins. In einer weiteren Ausführungsform wird der Threonin-Rest an Position 35 bzw. 37 eines kleinen
- 10 GTP-bindenden Proteins der Rho-Familie glykosyliert. Dieses führt ebenfalls zur Inaktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins. Gleichzeitig werden vorzugsweise die kleinen GTP-bindenden Protein Cdc42 und/oder Rac aktiviert. (Dies könnte beispielsweise durch Crosstalk der beiden Signaltransduktionswege erfolgen. Unter Crosstalk versteht der Fachmann die wechselseitige Beeinflussung
- 15 verschiedener Signaltransduktionswege innerhalb einer Zelle. Im vorliegenden Fall könnte beispielsweise die Inaktivierung des Signalweges, der die GTP-bindenden Proteine Rho A, B oder C beinhaltet, eine Aktivierung des Signalweges unter Beteiligung von Cdc42 und /oder Rac bewirken. (siehe hierzu Mueller BK, 1999, Annu Rev Neurosci 22: 351-388; Wahl S, Barth H, Ciossek T,
- 20 Aktories K, Mueller BK, 2000, J. Cell. Biol. 149: 263-270; Sander EE, Ten Klooster JP, Van Delft S, Van der Kammen RA, Collard JG, 1999, J Cell Biol 147: 1009-1022).

- Vorzugsweise ist die Modulationsdomäne von einem Toxin abgeleitet. Hierbei
- 25 kann es sich z. B. um bakterielles Toxin handeln. Bakterielle Toxine könnten aus einem Bakterium der Gattung Clostridium, Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas, Salmonella oder Yersinia stammen. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um die C3-Transferase aus Clostridium botulinum oder eine verwandte Transferase. Unter einer verwandten Transferase versteht man ein
- 30 Enzym das wie die C3-Transferase die ADP-Ribosylierung von GTP-bindenden Proteinen der Rho-Familie bewirkt.

Einen weiteren Teil des Fusionsproteins bildet die Bindungsdomäne. Sie bewirkt die Bindung an den Transporter. Die Bindung der Bindungsdomäne an den Transporter erfolgt z. B. durch kovalente Bindung, durch elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen oder Wasserstoff-
5 Brücken-Bindung. In einer Ausführungsform stammt die Bindungsdomäne von einem binären bakteriellen Toxin, insbesondere dem C2-Toxin aus *Clostridium botulinum*.

Unter einem binären Toxin versteht man ein Toxin, das aus zwei getrennten
10 Proteinen besteht. Die Proteine sind eine Enzym-Komponente und eine Zellbindungs-/Translokationskomponente. Beispiele für binäre Toxine sind das Anthrax-Toxin oder das Toxin aus *Clostridium perfringens* iota. Das *Clostridium perfringens* iota Toxin ist ein Mitglied der Familie der binären Aktin ADP-ribosylierenden Toxine. Besonders bevorzugt stammt die Bindungsdomäne von
15 dem C2-Toxin von *Clostridium botulinum*. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Bindungsdomäne um die N-terminale C2I-Domäne des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*.

Der Transporter vermittelt die Aufnahme des Fusionsproteins in die Zelle. Bei
20 dem Transporter kann es sich beispielsweise um ein Peptid oder Protein handeln. Ein Beispiele für ein solches Protein oder Peptid ist das Antennapedia Peptid, ein 16 Aminosäuren-langes Peptid des *Homoeobox*-Gens *Antennapedia*, welches eingesetzt wird, um exogene, hydrophile Komponenten ins Innere lebender Zellen einzuschleusen (Prochiantz A, 1999, Ann NY Acad Sci 886: 172-179; Prochiantz
25 A, 1996, Curr Opin Neurobiol 6: 629-634)

Der Transporter könnte aber auch ein virales Protein oder einen Liganden für eine Zelloberflächenstruktur darstellen oder davon abgeleitet sein. Ein Beispiel für ein
30 virales Transportprotein ist VP22, ein 38 kDA großes Strukturprotein des Herpes Simplex-Virus-1. Diese Protein transloziert (permeiert) die Plasmamembranen von Säugerzellen und kann als Transporter andere Proteine ins Innere der Zellen transferieren (O'Hare P und Elliot G, 1997, Cell 88: 223-233; Phelan A; Elliott G;

O'Hare P, 1998, Nat Biotechnol 16: 440-443). Beispiele für Liganden von Oberflächenstrukturen stellen das pflanzliche Toxin Ricin und das bakterielle Shiga Toxin dar (Sandvig K und van Deurs B, 2000, EMBO J 19: 5943-5950).

5 Beispielsweise könnten aber auch Liposomen die Transporterfunktion erfüllen. Mit Hilfe von liposomalen Transportern können neben Nukleinsäuren auch Proteine in Zellen eingeschleust werden (Rao M und Alving CR, 2000, Adv Drug Delv Res 30: 171-188). Die Aufnahme in die Zelle kann beispielsweise durch die Fusion durch die Zellmembran, durch Durchtritt durch Zellporen, durch
10 erleichterte Diffusion, aktiven Transport mittels Carrier in der Zellmembran oder durch Pinozytose und Phagozytose erfolgen. In einer Ausführungsform wird die Aufnahme des Fusionsproteins über die Bindung des Transporters an eine Struktur an der Zelloberfläche bewirkt. Diese Struktur könnte z. B. ein Rezeptor, ein Kanal oder ein anderes Membranprotein sein. Die Struktur an der Oberfläche
15 bewirkt die Aufnahme der Zusammensetzung oder eines Teils davon in die Zelle. Die Aufnahme des Fusionsproteins könnte z. B. durch Endozytose eines Rezeptor-Protein-Komplexes erfolgen. In der Zelle könnte der Proteinkomplex freigesetzt werden und anschließend die Aktivität des kleinen GTP-bindende Proteins verändern.

20

Bei dem Transporter kann es sich z. B. um einen Liganden handeln. Liganden sind Moleküle, die spezifisch an bestimmte Rezeptoren binden. Bei diesen Liganden könnte es sich beispielsweise um körpereigene Moleküle wie Hormone, Neurotransmitter wie z.B. Acetylcholin oder um körperfremde Moleküle wie
25 künstlich hergestellte Liganden handeln. Die Liganden können peptidergen, proteinergeren oder nicht-proteinergeren Ursprungs sein. In einer Ausführungsform könnte der Transporter die variablen Region eines Antikörpers z. B. eines monoklonale Antikörpers darstellen oder mit dieser verbunden sein. Diese Region könnte die spezifische Bindung an Zelloberflächenstrukturen bewirken.

30

Die Aufnahme in die Zelle könnte aber auch durch Liposomentransporter (Rao M und Alving CR, 2000, Adv Drug Delv Res 30: 171-188) bewirkt werden. Hierbei

wäre das Fusionsprotein z. B. in Liposomen eingeschlossen. Die Bindungsdomäne wäre so gestaltet, daß das Fusionsprotein besonders geeignet für den Einschluß in ein Liposom wäre. Das Liposom würde mit der Zellmembran fusionieren und so die Aufnahme des Fusionsproteins in die Zelle bewirken. Dem Fachmann sind
5 geeignete Lipide bekannt, die zur Bildung von Protein-Liposomen-Komplexen verwendet werden können.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Aufnahme des Fusionsproteins durch einen viralen Transporter. Ein Beispiel für ein virales Transportprotein ist - wie bereits
10 erwähnt - VP22 (O'Hare P und Elliot G, 1997, Cell 88: 223-233; Phelan A; Elliott G; O'Hare P, 1998, Nat Biotechnol 16: 440-443).

In einer bevorzugten Ausführungsform stammt der Transporter von einem binären bakteriellen Toxin. Beispiele für binäre Toxine sind das Anthrax-Toxin oder das
15 Toxin aus Clostridium perfringens iota. Das Clostridium perfringens iota Toxin ist ein Mitglied der Familie der binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine. Besonders bevorzugt stammt der Transporter von dem C2-Toxin von Clostridium botulinum. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Transporterprotein um C2II-Domäne des C2-Toxins von Clostridium
20 botulinum.

Die Herstellung des Arzneimittels enthaltend die Zusammensetzung enthaltend mindestens ein Fusionsprotein und mindestens einen Transporter erfolgt in üblicher Weise anhand geläufiger pharmazeutisch-technologischer Verfahren.
25 Dazu werden die Wirkstoffe als solche oder in Form ihrer Salze zusammen mit geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Zusatzstoffen zu den für die Indikation und den Applikationsort geeigneten Arzneiformen verarbeiten.

Geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, die beispielsweise der Stabilisierung oder
30 Konservierung des Arzneimittels oder Diagnostikums dienen, sind dem Fachmann allgemein bekannt (siehe z. B. Sucker H et al. (1991) Pharmazeutische Technologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Beispiele für solche

Hilfs- und/oder Zusatzstoffe sind antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren, Aqua sterilisata, den pH-Wert beeinflussende Substanzen, wie z.B. organische und anorganische Säuren und Basen sowie deren Salze, Puffersubstanzen zur Einstellung des pH-Wertes, Isotonisierungsmittel, wie z.B. Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Glucose und Fructose, Tenside bzw. oberflächenaktive Substanzen und Emulgatoren, wie z.B. Partialfettsäureester des Polyoxyethylensorbitans (Tween®) oder z.B. Fettsäureester des Polyoxyethylens (Cremophor®), fette Öle, wie z.B. Erdnussöl, Sojabohnen öl und Rizinusöl, synthetische Fettsäureester, wie z.B. Ethyloleat, Isopropylmyristat und Neutralöl (Miglyol®), sowie polymere Hilfsstoffe wie z.B. Gelatine, Dextran, Polyvinylpyrrolidon, von die Löslichkeit erhöhenden Zusätzen organischer Lösungsmittel wie z.B. Propylenglycol, Ethanol, N,N-Dimethylacetamid, Propylenglycol oder komplexbildender Stoffe, wie z.B. Citraten und Harnstoff, Konservierungsmittel, wie z.B. Benzoesäurehydroxypropyl- und -methylester, Benzylalkohol, Antioxidantien, wie z.B. Natriumsulfit und Stabilisatoren, wie z.B. EDTA, verwendet werden.

Das Arzneimittel könnte in parenteraler Anwendungsform, insbesondere in intrathekalen, intramedullärer, intraartikler, intravenöser, intramuskulärer oder subcutaner Form, insbesondere an der Verletzungsstelle, in intradermalen Form, beispielsweise als Plaster, in enteralen Anwendungsform, insbesondere zur oralen oder rektalen Anwendung, oder in topischer Anwendungsform, insbesondere als Dermatikum, angewendet werden.

Unter einer akuten Verletzung oder Erkrankung des Gehirns und/oder des Rückenmarks versteht man im Gegensatz zu einer chronischen Erkrankung eine plötzlich auftretende oder einsetzende Verletzung oder Erkrankung. Beispiele hierfür sind Schädel-Hirn-Traumen infolge von äußerer Gewalteinwirkung; Infektionen, bedingt durch Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten; Schlaganfälle (zerebrale Durchblutungsstörung und intezerebrale bzw. subarachnoidale Blutungen); Intoxikationen; traumatische Rückenmarksläsionen.

Unter einer chronischen Verletzung und/oder Erkrankung des Gehirns oder des Rückenmarks versteht man eine sich langsam entwickelnde, schleichende Erkrankung von in der Regel langer Dauer. Beispiele für chronische Erkrankungen des Gehirns und des Rückenmarks sind Morbus Alzheimer,
5 Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, Tumore und ähnliche Erkrankungen.

Entzündlichen Erkrankung des Nervensystems, die mit Entmarkungsschäden einhergeht, sind beispielsweise Multiple Sklerose oder Leukodystrophien.

10 Unter Remyelinisierung versteht man den teilweisen oder völligen Wiederaufbau der Myelinschicht nach Demyelinisierung. Demyelinisierung ist die Schädigung und/oder der Verlust von Myelin im zentralen oder peripheren Nervensystem und entsteht als Folge verschiedener Erkrankungen des Nervensystems oder nach
15 allgemeinen Schädigungen von Neuronen oder der Oligodendrozyten durch beispielsweise entzündliche, immunpathologische oder toxische Vorgänge. Beispiele hierfür sind Multiple Sklerose, die Leukodystrophien oder Viruserkrankungen wie Hundestaupe.

Unter neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen des peripheren und
20 zentralen Nervensystems werden beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose und ähnliche Erkrankungen, die mit einem Nervenfaserverlust und Entmarkung (Demyelinisierung) einhergehen, sowie Amyotrophe Lateral Sklerose und andere Motoneuonenerkrankungen, Ischämie, Schlaganfall, Epilepsie, Morbus Huntington, AIDS Demenz Komplex und
25 Prionen-Erkrankungen verstanden.

Die Erfindung wird in den nachfolgenden Figuren und Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne sie darauf einzuschränken.

30 Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Schematische Darstellung des besonders bevorzugten Systems enthaltend ein Fusions- und ein Transporterprotein

Das Fusionsprotein besteht aus der Modulationsdomäne, die von der C3-Transferase aus *C. limosum* abgeleitet ist, und der Bindungsdomäne, die von dem N-terminalen Ende des C2I-Untereinheit des C2-Toxins aus *C. botulinum* stammt.
Die C2II-Untereinheit des C2-Toxins aus *C. botulinum* stellt den Transporter dar.

Die einzelnen Abbildungen stellen folgende Moleküle dar:

- A C2-Toxin aus *Clostridium botulinum*
- 10 B C3-Exoenzym aus *Clostridium limosum*
- C Transporter-Protein C2II
- D Fusionsprotein C3-C2IN bestehend aus Bindungs- (C2IN) und Modulationsdomäne (C3)

15 Figur 2: Verbesserung der motorischen Funktionen nach C3-C2IN-Gabe

Die Wiederherstellung der motorischen Funktionen unterschiedlich behandelter Tiere wurde in Abhängigkeit von der Genesungsdauer bestimmt. Die mit C3-C2IN in Gegenwart von C2II behandelten Ratten (Kreis; ●) zeigten gegenüber den Kontrolltieren (Dreieck; ▲) und Tieren, die lediglich mit C2II behandelt wurden (Quadrat; ■), eine deutlich höhere motorische Genesung. Nach 28 Tagen erreichten die C3-C2IN-behandelten Tiere auf der BBB-Skala einen Wert von 11,50 ($\pm 1,15$) im Gegensatz zu den Kontrolltieren und die C2II-behandelten Tieren, mit denen Werte von 4,00 ($\pm 0,90$) und 2,71 ($\pm 1,09$) erzielt wurden.

25 Figur 3: Intraspinale Akkumulation von aktivierten Makrophagen nach C3-C2IN/C2II-Gabe

Die Anzahl von ED-1 positiven Makrophagen als Antwort auf die intramedulläre Injektion von 10 μ g C3-C2IN/10 μ g C2II wurde nach 1, 3 und 7 Tagen und nach 4 Wochen bestimmt. Als Kontrolle wurde die Anzahl von ED-1 positiven Makrophagen bei Tieren ohne Substanzgabe und bei Tieren mit PBS-Gabe (PBS: phosphate buffered saline, pH 7,4) an den Tagen 1 und 3 bestimmt. Bereits ein Tag nach der Injektion der Substanzen war die Anzahl der Makrophagen um den Faktor 23 erhöht, am Tag 3 um den Faktor 47. Am siebten Tag erreicht die

Anzahl der Makrophagen ihr Maximum (Erhöhung um Faktor 65) und nach 4 Wochen liegt sie mit 162 ED-1 positive Makrophagen/0,25 mm² immer noch um den Faktor 28 über dem Normalwert (5,8 ED-1 positive Makrophagen/0,25 mm²)

5 Die einzelnen Säulen der Abbildung bedeuten:

- | | | |
|------|--------------------|----------------------------|
| A | unbehandelt | |
| B | PBS-Gabe; | Untersuchung am 1. Tag |
| C | C3-C2IN/C2II-Gabe; | Untersuchung am 1. Tag |
| D | PBS-Gabe; | Untersuchung am 3. Tag |
| 10 E | C3-C2IN/C2II-Gabe; | Untersuchung am 3. Tag |
| F | C3-C2IN/C2II-Gabe; | Untersuchung am 7. Tag |
| G | C3-C2IN/C2II-Gabe; | Untersuchung nach 4 Wochen |

15 **Figur 4: Histologie zur intraspinalen Akkumulation von aktivierten Makrophagen nach C3-C2IN/C2II-Gabe**

Die Akkumulation von ED-1 positiven Makrophagen als Antwort auf die intramedulläre Injektion von 10 µg C3-C2IN/10 µg C2II ist direkt an der Injektionsstelle stark erhöht. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt die
20 immunhistologische Anfärbung der Makrophagen 1 cm von der Injektionsstelle entfernt immer noch eine erhöhte Akkumulation.

Die einzelnen Abbildungen zeigen:

- | | |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | ED-1 positive Makrophagen an der Injektionsstelle von C3-C2IN/C2II |
| 25 B | ED-1 positive Makrophagen in einem Abstand von 1 cm von der Injektionsstelle von C3-C2IN/C2II |
| C | Kontrolle/unbehandelt |

30 **Figur 5: Diagram zur reduzierten intraspinalen Akkumulation Vimentin⁺reaktiver Astrozyten und fibroblastoider Zellen nach C3-C2IN/C2II-Gabe**

Aktivierte Astrozyten und fibroblastoide Zellen wurden immunhistochemisch mit Vimentin-Antikörpern markiert und ausgezählt. Die Anzahl Vimentin⁺reaktiver Astrozyten und fibroblastoider Zellen 3 Tage nach C3-C2IN/C2II-Gabe (C) ist im Vergleich zur alleinigen PBS-Gabe (B) stark reduziert. (A) zeigt die Anzahl Vimentin⁺reaktiver Astrozyten und fibroblastoider Zellen bei unbehandelten Kontrolltieren.

Die einzelnen Abbildungen zeigen die Anzahl Vimentin⁺reaktiver Astrozyten und fibroblastoider Zellen:

- 10 A unbehandelte Kontrolltiere
- B mit PBS behandelte Tiere
- C mit C3-C2IN/C2II behandelte Tiere

15 **Figur 6: Auswachs-Assay retinaler Ganglienzell-Axone auf Chondroitin-sulfat-Proteoglykan (CSPG)**

Die Neutralisation inhibitorischer Narbenbestandteile durch C3-C2IN/C2II wurde im Auswachs-Assay auf CSPG gezeigt. Hierzu wurden Retina-Miniexplantate von embryonalen Hühnchen (E7) auf mit 20µg/ml CSPG beschichteten Deckgläsern ausplattiert. CSPG hemmt das Auswachsen retinaler Ganglienzell-Axone (A). Die Zugabe von 1ml C3-C2IN/C2II (300ng/ml) führt zur Neutralisierung der inhibitorischen Wirkung von CSPG und zum Auswachsen retinaler Axone (B).

- 25 Die einzelnen Abbildungen zeigen das Auswachsen retinaler Ganglienzell-Axone:
- A Inkubation mit CSPG
 - B Inkubation mit CSPG und C3-C2IN/C2II

30 **Beispiel 1**

Die Konstruktion, Expression, Reinigung und Charakterisierung der Proteine erfolgte wie in DE 197 35 105 A1 Beispiele 1 bis 5 beschrieben.

Beispiel 2

Tiere: 8-12 Wochen alte, männliche Lewis-Ratten (220-280 g, Charles River, Sulfeld, GER) wurden zufällig auf zwei Gruppen verteilt und das Rückenmark mindestens zur Hälfte durchtrennt. Nach 21 Tagen wurde eine Gruppe mit 10 µg C3-C2IN und eine zweite Gruppe nur mit 10 µg C2II perfundiert. Die Kontrolltiere erhielten entweder 10 µl C2 alleine (ohne C3-Komponente) oder eine Transektion ohne Injektion. Alle Tiere wurden unter kontrollierten Licht- und Temperaturbedingungen gehalten und mit Futter und Wasser zur freien Verfügung ausgestattet. Die Ratten wurden entsprechend den "International Health Guidelines" so wie einem von der Universität Tübingen überprüften Protokoll gehalten.

Rückenmarksläsionen: Die Ratten wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketanest (Ketaminhydrochlorid, Parke Davis: 100 mg/kg) und Rompun (Xylazinhydrochlorid, Bayer: 10 mg/kg) betäubt. Um eine Austrocknung der Augen während der Anästhesie zu erreichen, wurden beide Augen mit Oculotect Gel (Retinolpalmitat, CIBA Vision, Novartis, GER) bedeckt. Nach Erreichen einer ausreichenden Anästhesie wurde die Haut über der Wirbelsäule geöffnet, die den Wirbeln anheftenden Muskeln gelöst und zur Freilegung des Rückenmarks eine Bi-Laminektomie auf Höhe des thorakalen Segments TH8 durchgeführt. Nach Öffnung der Dura (äußerste, fibröse Hülle des Rückenmarks) wurde der dorsale Rückenmarksstrang mit einer feinen Iridektomie-Schere durchtrennt, um eine 2/3 Überhemisektion durchzuführen. Die durchtrennten neuralen Strukturen waren sowohl motorischen (gekreuzter Teil der Pyramidenbahn, Teile der extrapyramidalen Bahn) als auch sensorischen (dorsales Rückenmark) Ursprungs. Die Wunde wurde mit steriler Salzlösung gespült und verschlossen. Alle Tiere wurden unter Infrarotlicht gewärmt, bis sie das Bewußtsein wiedererlangten.

30

Postoperative Behandlung und Gewebspräparation: Alle Ratten erhielten eine postoperative Schmerztherapie durch eine einzelne intraperitoneale Injektion von

Rimadyl 2 mg/kg (Carproven, Pfizer, GER) und wurden einer manuellen Blasenentleerung (3 x täglich) unterzogen, bis die spontane Blasenfunktion wiederhergestellt war (gewöhnlich innerhalb von 10-14 Tagen). Vor dem Wiedereintritt der spontanen Blasenfunktion wurden die Ratten 2-3 x täglich gebadet, um Urin-bedingte Wunden zu verhindern. Die Tiere wurden regelmäßig gewogen und bei einem Gewichtsverlust 20% oder mehr getötet. Für immunhistologische Untersuchungen wurden Ratten getötet und intrakardial mit Fixativ (4% Formalin in 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,5), das 20.000 IU/l Heparin enthielt, perfundiert. Rückenmark und Gehirn wurden entfernt und über Nacht bei 4°C nachfixiert. Das fixierte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet, Serienschnitte angefertigt und diese auf Silan-beschichteten Objektträgern überführt.

Immunhistochemie: Nach Fixierung mit Formalin und Einbettung in Paraffin wurden rehydrierte 2µm-Stücke 7 Mal für 5 Minuten in Citratpuffer (2,1 g/l Natriumcitrat, pH 6) gekocht und mit 10% normalem Schweineserum (Biochrom, Berlin, GER) inkubiert, um die nicht-spezifische Bindung von Immunglobulinen zu unterdrücken. Zur Identifizierung bestimmter Zelltypen wurden Antikörper gegen zellspezifische Antigene benutzt. Dies waren beispielsweise GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, Boehringer Mannheim, GER, 1:100) für Astrozyten, MBP (Myelin Basic Protein, Dako, Glostrup, DEN, 1:200) für Oligodendrozyten oder Neurofilament (Dako, Glostrup, DEN, 1:200) für Neurone. Mikroglia bzw. Makrophagen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen ED1 (Serotec, Oxford, GB, 1:100), OX-42 (Serotex, Oxford, BG, 1:100) oder ED2 (Serotec, Oxford, BG, 1:200) unter Verwendung des ABC-Verfahrens (avidin-biotin-complex) in Kombination mit alkalinen Phosphatasen-Konjugaten markiert. Zusätzlich wurden monoklonale Antikörper gegen OX-22 (Serotec, Oxford, GB, 1:100) zur Identifikation von B-Lymphozyten und W3/13 (Serotec, Oxford, GB, 1:100) zur Identifikation von T-Lymphozyten verwendet. OX-6 (Serotec, Oxford, GB, 1:100) wurde eingesetzt, um MHC-II-Moleküle zur Charakterisierung der funktionellen Immunkompetenz zu identifizieren. Die Antikörper wurden in den oben angegebenen Lösungen mit 1% TRIS-gepuffertem bovinem Serumalbumin

(BSA/TBS) auf die Objektträger gegeben. Die Bindung wurde durch Zugabe eines Biotin-gekoppelten zweiten Antikörper (1:400; 30 min.) und eines alkalischen Phosphatase-konjugierten ABC-Komplexes (1:400 in BSA/TBS; 30 min.) sichtbar gemacht.

5

Histologische Färbung auf Myelin und Nuklein: Die seriellen Gewebsschnitte, die zur Immunhistochemie verwendet wurden, wurden mit Luxol Fast-Blue auf Myelin gefärbt. Ausgehend vom Läsionszentrum wurden rostral und kaudal in verschiedenen Abständen (0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0 cm) die Gebiete des Gewebes identifiziert, die offensichtlich beschädigt waren oder einen Mangel an Myelin aufwiesen. Die Kerne wurden mit Kresylviolett (0,1%) angefärbt, um intakte und beschädigte Gebiete der grauen Substanz unterscheiden zu können. Die Schnitte zeigten, daß die mit C3-C2IN in Gegenwart von C2II behandelten Ratten weniger Sekundärschäden aufwiesen. Die Lakunenformation und Höhlenbildung war an den so behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren deutlich reduziert. Gleichzeitig konnten mehr Zellen, weniger Aussparungen und eine erhöhte Neuronensprossung nachgewiesen werden.

Stereotaktische Mikroinjektion: Um exakt definierte Mengen (10 x 1 µl, 10 µg) von C3-C2IN Toxin in den rostralen Stumpf des durchtrennten Rückenmarks injizieren zu können, wurden Mikrokapillaren sowie ein stereotaktischer Apparat benutzt. Um das Rückenmark weiterhin zu stabilisieren, wurde eine Vorrichtung zur Anhebung der Ratte gebaut, die eine Ausdehnung der Atembewegung auf die Wirbelsäule blockierte.

25

Anterograde Markierung: 30 µl (30 µg, 15 µl pro Seite biotinyliertem Biodextran (BDA, 10.000 kDa) wurden mittels Hamilton-Spritze in die motorischen Cortex-Gebiete injiziert. Nach Injektion wurde die Wunde gewaschen und verschlossen. Diese Methode dient der Darstellung von regenerierten axonalen Fasern des Corticospinaltrakts (CST). Das biotinylierte Biodextran wird von den motorischen Kortex-Gebieten in das Rückenmark transportiert. Alle Fasern, die unterhalb der Läsionsstelle biotinyliertes Biodextran

30

enthalten, müssen folglich neu gewachsen sein. Die mit C3-C2IN in Gegenwart von C2II behandelten Ratten zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren ein deutlich erhöhtes Nervenfaserverwachsen. Hierbei war sowohl die Anzahl der Fasern als auch die Länge der neugewachsenen Fasern deutlich erhöht. Die neu gewachsenen Fasern waren GAP43⁺ (Nachweis mittels polyklonaler Antikörper) womit sie als neuronale, aussprossende Fasern identifiziert wurden.

Sensorische und lokomotorische Beurteilung: Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 1-21 Tagen nach dem Verletzungsereignis in Hinblick auf die Funktionswiederkehr beobachtet und unter Verwendung des "Combined Sensory-Motor Gale-Score" (Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR, 1985, Spinal cord contusion in the rat: behavioural analysis of functional neurologic impairment. Exp Neurol 88: 123-134) unter Einbeziehung der schiefen Ebene (Rivlin AS, Tator CH, 1977, Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. J Neurosurg 47: 577-581) und dem "Motor Openfield BBB-Score (Basso D; Beatti MS, Bresnahan JC, 1996, Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. Exp Neurol 139: 244-256) beurteilt.

In zwei unabhängigen Experimenten zeigten Ratten, welche C3-C2IN erhalten hatten eine signifikante ($p < 0,0001$) Verbesserung der sensorischen und motorischen Funktion im Vergleich zu Ratten, die lediglich aktives oder inaktives C2-Transporterprotein erhalten hatten oder Ratten, die der Kontrollgruppe angehörten. Die Verbesserung der sensorischen und motorischen Funktion trat bereits nach dem dritten Tag ein und erreichte ein Maximum 21 Tage nach dem Verletzungsereignis. Vor der Applikation wurde die biologische und funktionelle Aktivität der C3-C2IN-Konstrukte in *In-vitro*-Versuchen zum Kollaps des Wachstumskegels überprüft. Es wurden Untersuchungen zur motorischen Funktion wie Zehspreizung, Ausrichtung, Aufrichtung, schiefe Ebene und zur sensorischen Funktion wie die Rückzugsreflexe der Hintergliedmaßen als Antwort auf Zug, Schmerz (manuell und Hitze) und Druck sowie Schwimmtests

durchgeführt. Ein dritter Versuch wurde als doppelblinde Versuchsanordnung durchgeführt und lieferte identische Ergebnisse.

In einem vierten Experiment wurde die Relevanz der C2-Transporter-Komponente für die funktionelle Wiederkehr analysiert. Die Mikroinjektion von C3-C2IN und inaktivierter C2-Komponente resultierte nicht in einer signifikanten Wiederkehr der Funktion. Diese Ergebnisse belegen, daß das aktive Transporter-Protein C2 zur Regeneration notwendig ist.

- 10 Die Verbesserung der motorischen Funktionen von C3-C2IN-behandelten Tieren wurde durch das Erscheinen einer funktionaler Haltung der Hintergliedmaßen (gewöhnlich eine Beugung in der Hüfte, dann den Knien und zuletzt eine Dorsiflexion in den Knöcheln), die ein Maximum (Mittelwert \pm SEM) von 12,2 Punkten (\pm 0,84) in der BBB-Wertung (0-21 Punkte) einschließ-
15 lich einer Gewichtsunterstützung der Hintergliedmaßen erreichte (Fig. 2). In den meisten Fällen ($< 80\%$) trat die Genesung symmetrisch ein. Die Kontrolltiere erreichten ein Maximum von 4,1 Punkten (\pm 0,5) in der BBB-Wertung und zeigten keine fortschreitende Verbesserung während des untersuchten Zeitraums. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen anderer
20 Gruppen (Basso et al., 1996; supra). Am 10. Tag nach der Durchtrennung zeigten die C3-C2IN-Tiere eine Verbesserung von bis zu 8-9 Punkten ("sweeping") im Vergleich zu dem ersten Untersuchungszeitpunkt, wogegen die Kontrolltiere unter 3 Punkten lagen. Ausschließlich im ersten Experiment beobachteten wir eine Verbesserung nach 21 Tagen bis zu 8 Punkten (\pm 0,58) auch in den Tieren, die nur
25 C2 erhielten. Im zweiten Experiment konnten wir den Effekt einer alleinigen C2-Gabe bis jetzt nicht bestätigen. Bis zum heutigen Tag war eine signifikante motorische Genesung einschließ- lich einer Gewichtsunterstützung der Hinterextremitäten auf Ratten beschränkt, die C3-C2IN-Konstrukte erhielten. Keine signifikante motorische Genesung trat bei den Tieren ein, die mit C3-C2IN
30 mit einer inaktiven C2-Transporter-Komponente, nur mit C2-Transporter-Komponente oder ohne Zugabe von irgendwelchen Komponenten (Kontrolltiere) blieben.

Die sensorische Genesung wurde mittels einer senso-motorischen Gale-Wertung quantifiziert. 21 Tage nach Injektion zeigten C3-C2IN behandelte Ratten ein vollständiges Zurückziehen der Hinterextremitäten als Antwort auf alle getesteten Stimuli (Berührung, Mechano-Rezeption, Temperatur) in einer Weise, die vergleichbar ist mit unbehandelten Ratten. C3-C2IN-Tiere erreichten bis zu 95% Genesung in dieser kombinierten Wertung, wogegen C2-Tiere oder Kontrolltiere weniger als 50% Genesung erreichten. Weiterhin wurde ein richtig ausgeprägter Tastsinn in C3-C2IN-Tieren beobachtet, der essentiell für ein spezifisches Ausrichten der Hinterextremitäten ist.

Histologische Veränderungen nach C2-C3IN/C2II-Gabe zeigen sich in der stark erhöhten Anzahl ED-1 positiver Makrophagen.

Morphologische Veränderungen charakterisiert durch (i) reduzierte Narbenbildung und (ii) reduzierte sekundäre Schadensphänomene wie Hohlraumbildung, wurden in C3-C2IN behandelten Tieren beobachtet. Die Gewebsneubildung wurde durch immunhistochemische Methoden (spezifische Antikörper, Nukleinfärbung) beschrieben und das die Läsionsstelle überbrückende Gewebe als Gewebe neuronalen Ursprungs (Neurofilament) identifiziert.

Eine durchgeführte Retranssektion oberhalb der ersten Läsionsstelle (Gh7) führte bei den Tieren, die eine über 95%ige Regeneration zeigten, führte erneut zur Lähmung der Hinterläufe. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Regeneration tatsächlich von corticospinalen Fasern oberhalb der ersten Läsionsstelle, die die Läsion überbrückten, bewirkt wurde.

Beispiel 3:

Wie in Beispiel 2 ausgeführt, wurde bei Ratten eine Laminektomie auf Höhe des thorakalen Segments TH8 durchgeführt, allerdings ohne daraufhin das Rückenmark zu durchtrennen. Durch die Dura hindurch wurde 20mal in das

Rückenmark eingestochen, um 10 µl C3C2I/C2II (2µg/µl in PBS) bzw. 10 µl PBS zu injizieren.

Die Tiere wurden nach drei Tagen, wie in Beispiel 2 beschrieben, perfundiert,
5 Gehirn und Rückenmark entnommen, fixiert und die Gewebe in Paraffin eingebettet und geschnitten.

Vimentin reaktive Astrozyten und fibroblastoide Zellen wurden immunhistochemisch mit Vimentin-Antikörpern markiert (Dako, Glostrup, DEN, 1: 15).

10 Die Reduktion der Narbengewebsbildung bei C3C2I/C2II-behandelten Tieren zeigte die histologische Auswertung: Die Anzahl der Vimentin positiven Astrozyten/fibroblastoide Zellen war, im Vergleich zu PBS-behandelten Tiere, um den Faktor 5,5 reduziert.

Beispiel 4:

Auswachs-Assay von retinalen Miniexplantaten auf CSPG

20 Hierzu wurden Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (200µg/ml, Sigma, DE, 30 min bei Raumtemperatur) und mit einem Proteingemisch aus CSPG (20µg/ml, Chemicon, DE) und Laminin (20µg/ml, Invitrogen, DE) 2h lang bei 37°C beschichtet und anschließend mit Hank's Puffer (PAA, AT) gewaschen.

25 Für die Präparation der Retina-Miniexplantate wurden die Augen embryonaler Hühnchen (E7) entnommen, die Retina isoliert, auf einer Gewebehackerplatte flach ausgebreitet und mit einem Gewebehacker 150 µm x 150µm große Quadrate gefertigt. Die Explantate wurden in Kulturmedium (F12, PAA, AT; 10% fetal calf serum Gold, PAA, AT; 2% chicken serum, Invitrogen, DE;
30 Penicillin/Streptomycin, 1: 100, PAA, AT; Glutamin, 1: 100, PAA, AT) aufgenommen und 20-30 Stück mit einer Pipette auf die beschichteten Deckgläschen übertragen. Diese wurden für 24h bei 37°C und 4% CO₂ in 24-

Wellplatten kultiviert. 300 ng C3C2I/C2II wurden zum Zeitpunkt des
Explantierens zugegeben.

5 Anschließend wurden die Miniexplantate mit 4% PFA (Merck, DE; über Nacht
bei 4°C) fixiert und das Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa-Färbung (Alexa 488,
Molecular Probes, NL, nach Anleitung) dargestellt.

10 CSPG hemmt das Auswachsen von Axonen aus retinalen Miniexplantaten. Durch
Zugabe von C3C2I/C2II wird diese hemmende Wirkung neutralisiert und Axone
wachsen aus.

Ansprüche:

- 5 1. Verwendung einer Zusammensetzung enthaltend mindestens ein Fusionsprotein und mindestens einen Transporter zur Herstellung eines Arzneimittels zur *In-vivo*-Stimulation des Nervenwachstums, zur *In-vivo*-Inhibition der Narbengewebsbildung, zur *In-vivo*-Reduktion eines Sekundärschadens und/oder zur *In-vivo*-Akkumulation von Makrophagen,
10 wobei das Fusionsprotein mindestens eine Bindungsdomäne für den Transporter und mindestens eine Modulationsdomäne zur Änderung der Aktivität von kleinen GTP-bindenden Proteinen enthält,
und der Transporter die Aufnahme des Fusionsproteins in eine Zelle
15 vermittelt.
2. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Transporter an eine Struktur an der Zelloberfläche, insbesondere einen Rezeptor oder ein Oberflächenprotein, bindet.
- 20 3. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Transporter ein viraler, liposomaler, ein proteinerger oder peptiderger Transporter ist.
- 25 4. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß der Transporter von einem binären bakteriellen Toxin, insbesondere von dem C2-Toxin aus *Clostridium botulinum*, stammt.

5. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationsdomäne das kleine GTP-bindenden Proteine, insbesondere Rho A-C, inaktiviert.
- 5 6. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationsdomäne, vorzugsweise durch kovalente Modifikation, am meisten bevorzugt durch ADP-Ribosylierung oder Glykosylierung, das kleine GTP-bindenden Proteine inaktiviert.
- 10 7. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationsdomäne das kleine GTP-bindenden Proteine, insbesondere Cdc42 und Rac, aktiviert.
8. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationsdomäne von einem Toxin abgeleitet ist.
- 15 9. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Toxin ein bakterielles Toxin ist, wobei das Bakterium insbesondere aus der Gruppe der Gattungen Clostridium, Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas, Salmonella oder Yersinia ausgewählt ist.
- 20 10. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Toxin das C3-Exoenzym aus Clostridium limosum oder eine verwandte Transferase ist.
- 25 11. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsdomäne ganz oder teilweise ein binäres bakterielles Toxin, vorzugsweise das C2-Toxin aus Clostridium botulinum, besonders bevorzugt die C2IN-Domäne enthält.

12. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-11 zur Behandlung eines Neuronenschadens.

5 13. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-12 zur Behandlung einer akuten und/oder chronischen Verletzung und/oder Erkrankung des Gehirns und/oder des Rückenmarks.

10 14. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-13 zur Behandlung einer neurologischen und neurodegenerativen Erkrankung des zentralen und/oder peripheren Nervensystems.

15 15. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-14 zur Behandlung einer entzündlichen Erkrankung des Nervensystems, die mit Entmarkungsschäden einhergeht.

16. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1-15 zur Stimulierung der Remyelinisierung.

1/6

A

C2II	C2IC	C2IN
------	------	------

B

C3

C

C2II

D

C2IN	C3
------	----

Fig. 1

2/6

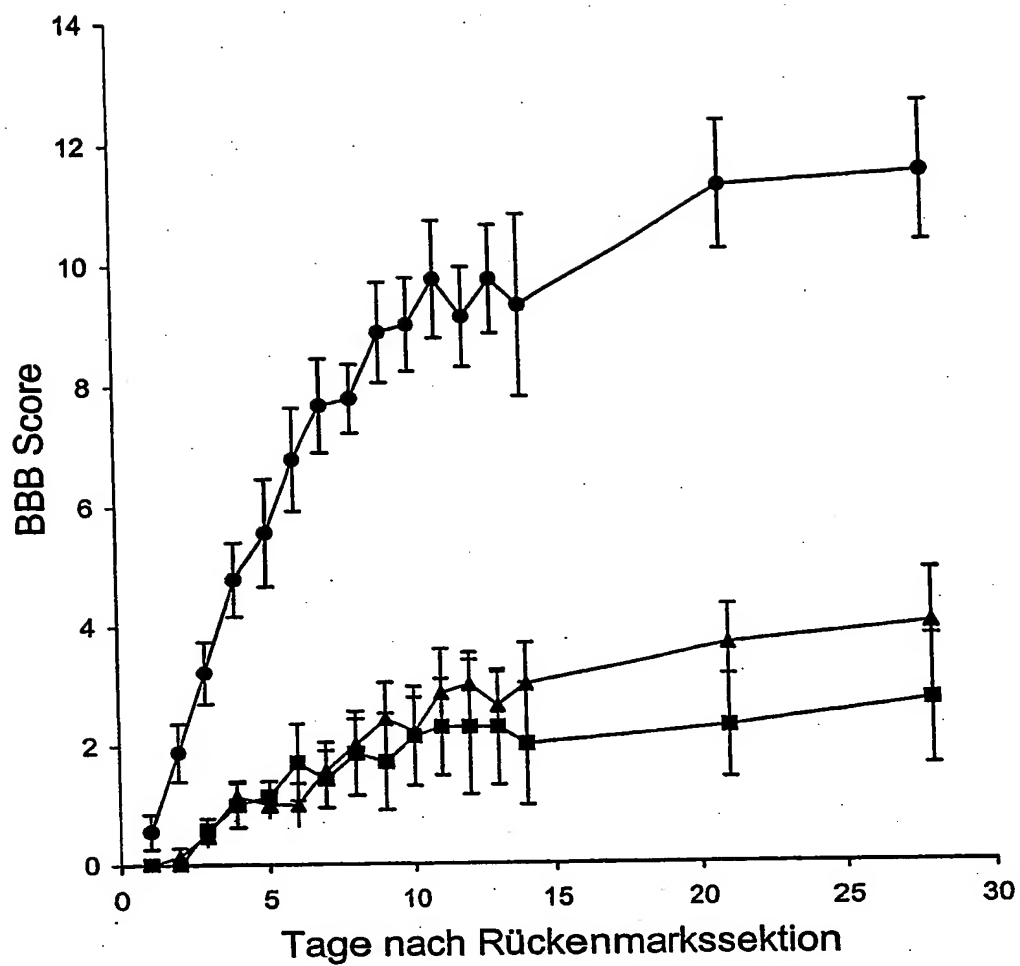


Fig. 2

3/6

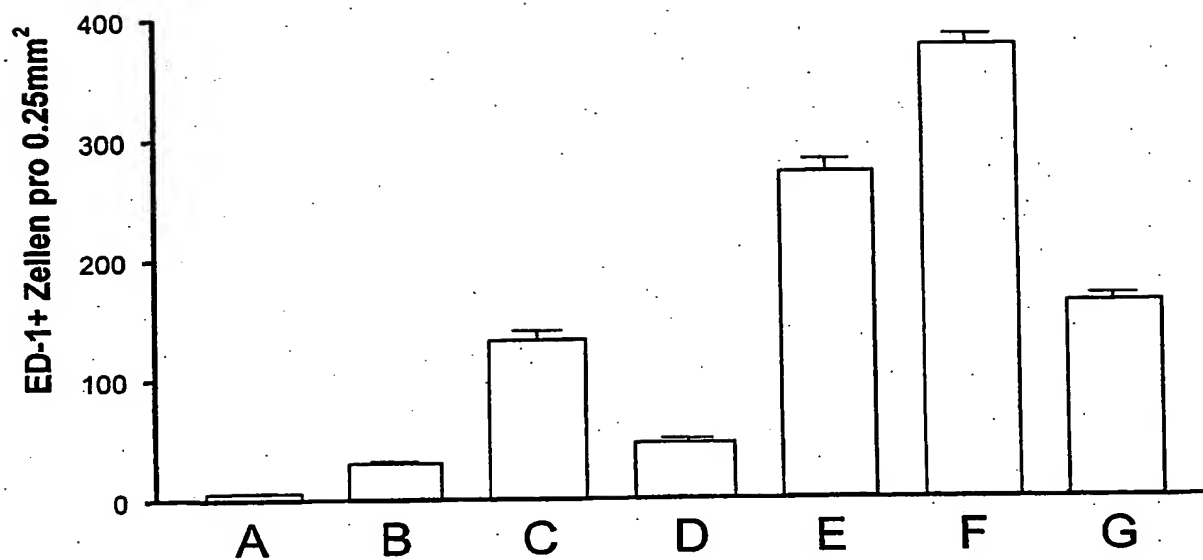
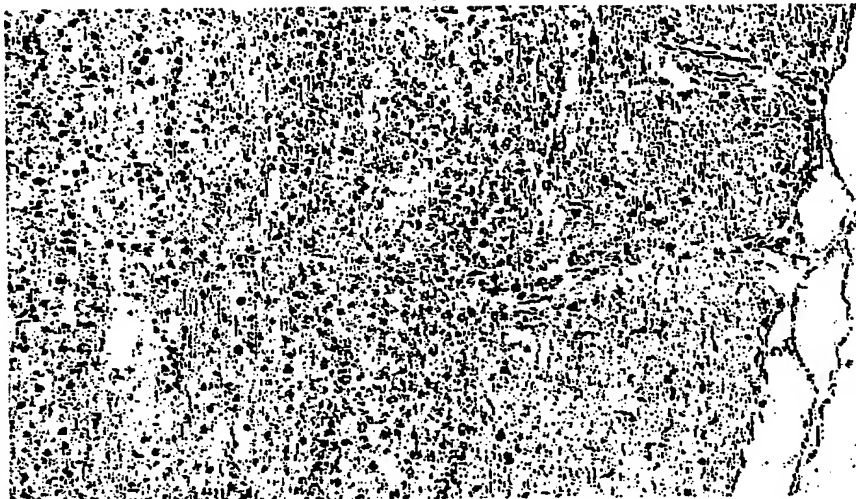


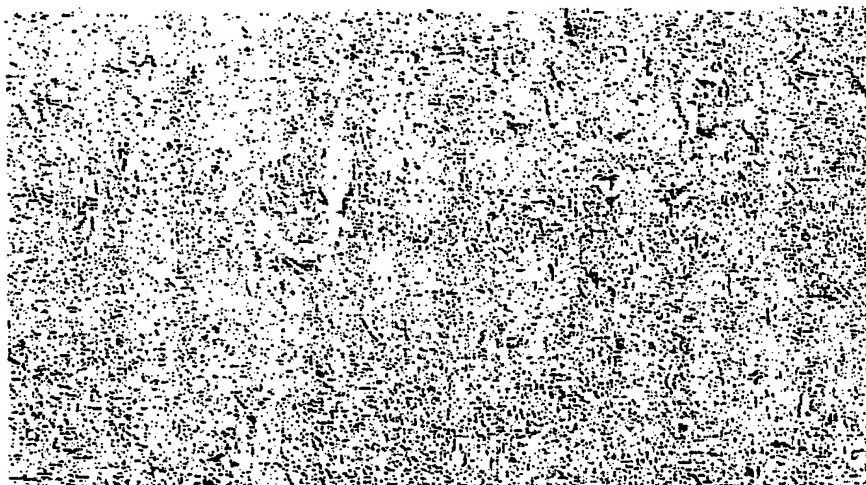
Fig. 3

4/6

A



B



C

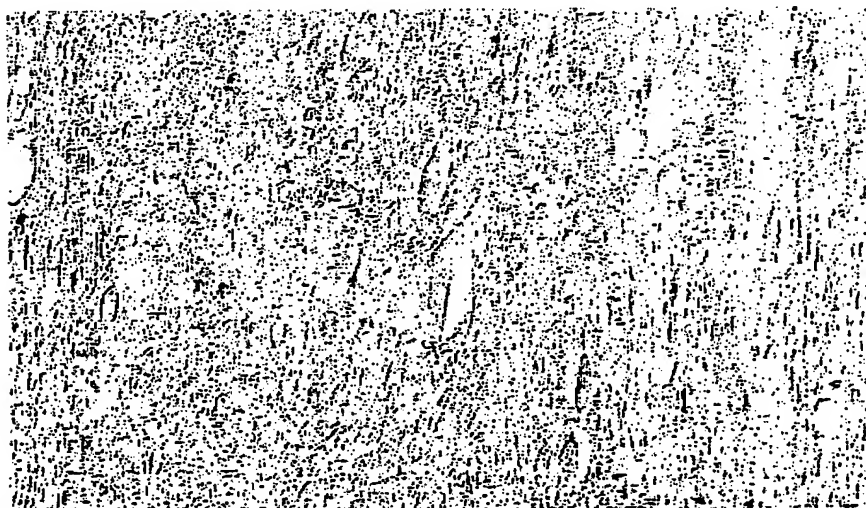


Fig. 4

5/6

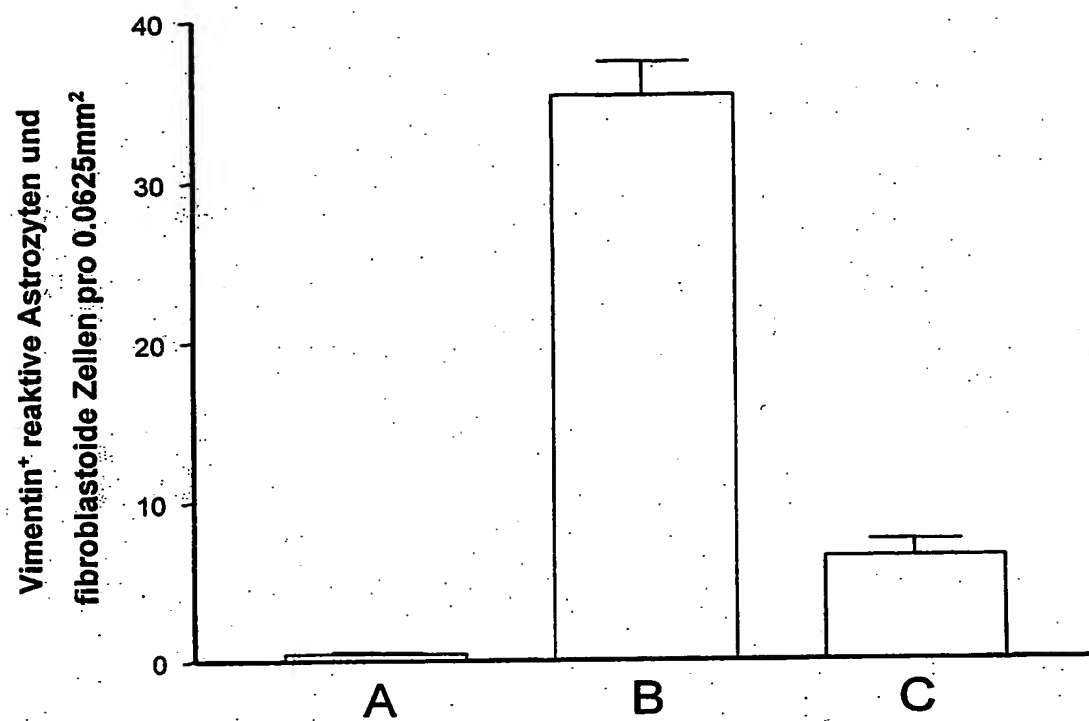
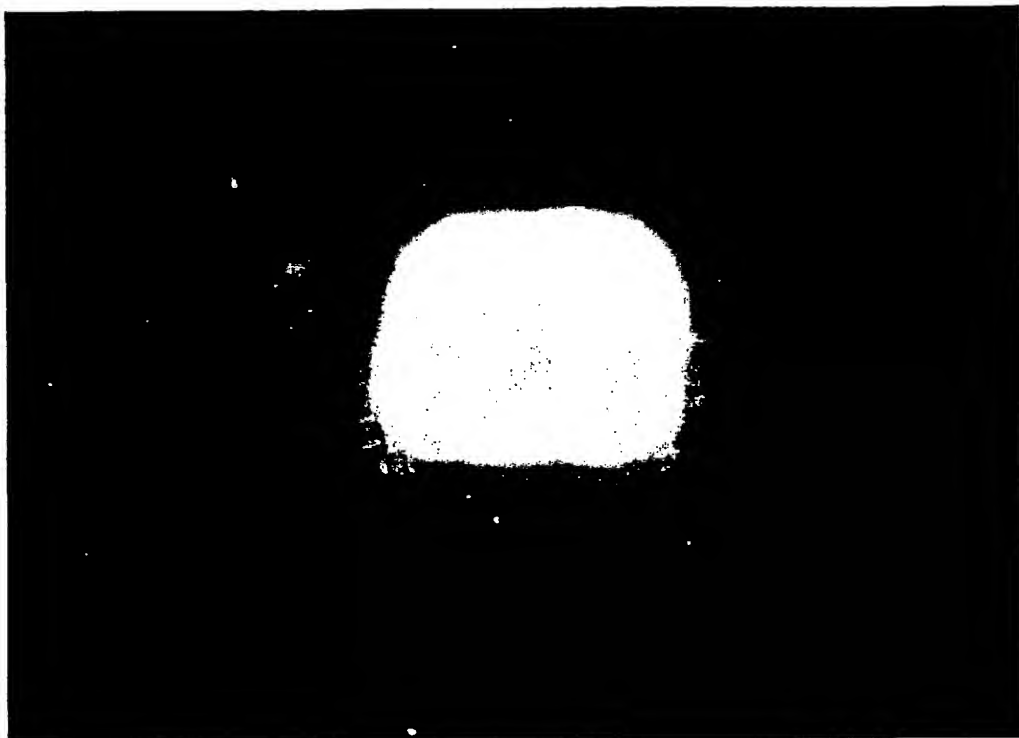


Fig. 5

6/6

A



B

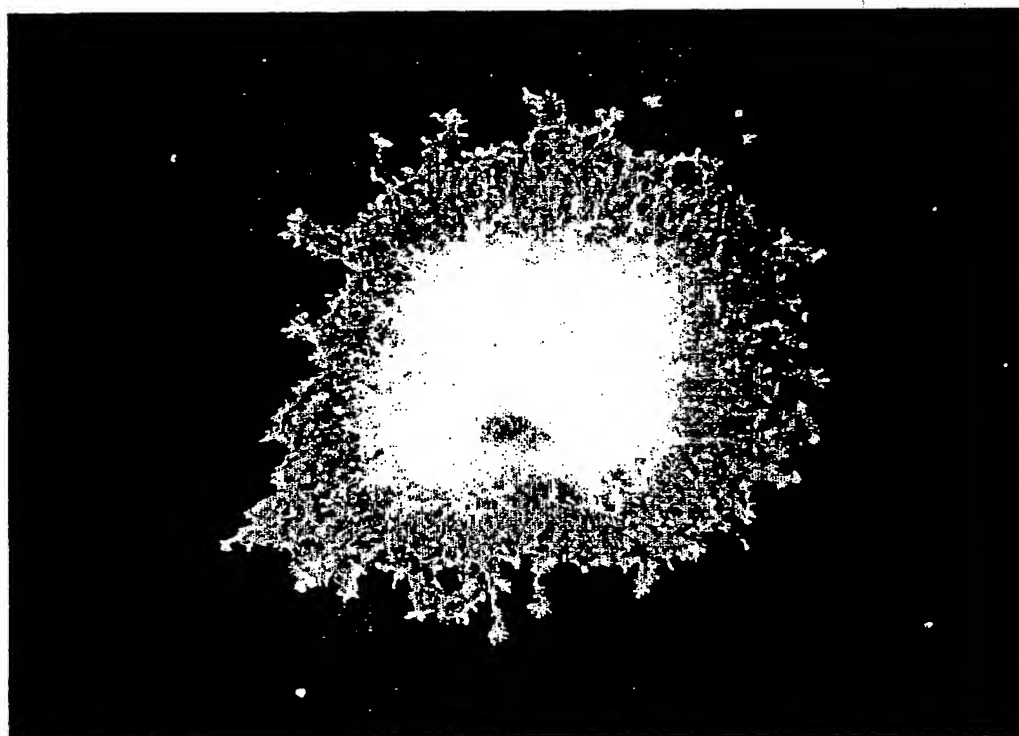


Fig. 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)